

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. Dezember 2000 (14.12.2000)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/74670 A1

PCT

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 31/277,
A61P 35/00, 35/04

(DE). KROEMER, Heyo, K. [DE/DE]; Wolgasterstrasse
40, D-17489 Greifswald (DE). SPERKER, Bernhard
[DE/DE]; Steinstrasse 43, D-17489 Greifswald (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/04848

(74) Anwalt: GRUSSDORF, Jürgen; Zellentin & Partner,
Rubensstrasse 30, D-67061 Ludwigshafen (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. Mai 2000 (27.05.2000)

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): CA, JP, RU, US.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 25 810.4 7. Juni 1999 (07.06.1999) DE

Veröffentlicht:

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): PAZ ARZNEIMITTEL-ENTWICKLUNGS
GESELLSCHAFT MBH [DE/DE]; In der Schildwacht
13, D-65933 Frankfurt am Main (DE).

— Mit internationalem Recherchenbericht.

— Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen.

(72) Erfinder; und

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GEISSLINGER, Gerd
[DE/DE]; Drei-Linden-Strasse 31, D-65812 Bad Soden

WO 00/74670 A1

(54) Title: USE OF VERAPAMIL AND VERAPAMIL DERIVATIVES FOR PRODUCING MEDICAMENTS WITH AN INHIBITING EFFECT ON β -GLUCURONIDASE IN HUMAN TISSUE

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON VERAPAMIL UND VERAPAMILDERIVATEN ZUR HERSTELLUNG VON ARZNEIMITTELN MIT β -GLUCURONIDASE IM HUMANEN GEWEBE HEMMENDER WIRKUNG

(57) Abstract: The invention relates to the use of verapamil or verapamil derivatives for producing medicaments which have an inhibiting effect on β -glucuronidase in human tissue.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Verapamil oder Verapamilderivaten zur Herstellung von Arzneimitteln mit Glucuronidase im humanen Gewebe hemmender Wirkung.

Verwendung von Verapamil und Verapamilderivaten zur Herstellung von Arzneimitteln mit β -Glucuronidase im humanen Gewebe hemmender Wirkung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von Verapamil oder Verapamilderivaten in Arzneimitteln zur Hemmung des Enzyms beta-Glucuronidase im humanen Gewebe mit dem Ziel, therapeutische Effekte direkt zu erzielen oder durch kombinierte Anwendung zusammen mit glucuronidierten oder glucuronidierbaren Wirkstoffen deren therapeutische Breite zu verbessern.

Die Konjugation von endogenen oder exogenen Stoffen mit Glucuronsäure ist eine wichtige Stoffwechselreaktion bei Mensch und Tier. Glucuronsäure kann mit den unterschiedlichsten Stoffen, z.B. Arzneimittelwirkstoffen und deren Metabolite konjugiert werden. Die Konjugationsreaktion erfolgt durch Übertragung von aktivierter Glucuronsäure (UDP-Glucuronsäure) auf das Substrat mittels des Enzyms Glucuronyltransferase. Der Organismus bedient sich der Konjugationsreaktionen im allgemeinen zur Entgiftung, da Glucuronsäurekonjugate üblicherweise weniger toxisch sind und aufgrund ihrer guten Wasserlöslichkeit leicht über die Nieren oder als Gallensekret über den Darm ausgeschieden werden. Eine Konjugation kann auch auf nichtenzymatischem Wege durch chemische Synthese erfolgen.

Die Glucuronsäurekonjugate können aber auch durch katalytische Wirkung von Glucuronidasen in Glucuronsäure und in das Ausgangsprodukt gespalten werden. Die Spaltung von Glucuroniden findet häufig nach Ausscheidung derselben über die Galle in tieferliegenden Dünndarmabschnitten oder im Dickdarm statt. Die dabei entstehenden Ausgangssubstanzen können wieder resorbiert und somit im Organismus erneut aktiv werden. Dieser als enterohepatischer Kreislauf bezeichnete Vorgang kann die erwünschte Wirkung von Substanzen verlängern, aber auch die toxischen Wirkungen giftiger Substanzen steigern.

Durch medikamentöse Regulierung der beta-Glucuronidase-Aktivität in den unterschiedlichen Geweben eröffnen sich neue Therapiekonzepte.

Anwendung von Glucuronidase-Hemmern in der Krebstherapie

Eine Besonderheit von Tumorgeweben ist ihre hohe Konzentration an beta-Glucuronidase bzw. eine extrem hohe Glucuronidaseaktivität. Eng assoziiert mit der erhöhten Glucuronidaseaktivität ist die Neigung bestimmter Tumore Metastasen zu bilden. Durch alleinige Gabe eines beta-Glucuronidasehemmers wird bei Tumoren, die aufgrund der erhöhten beta-Glucuronidaseaktivität zur Progression und Metastasenbildung neigen, die Tumorausbreitung über die Hemmung der Tumorglucuronidase reduziert. Saccharo-1,4-lacton, 2-Acetamidoglycal und Heparinderivate wurden zu diesem Zweck getestet [Bernacki R. J., Cancer Metastasis Rev (1985) 4: 81-101; Nakajima M., Journal of Cellular Biochemistry (1988) 36: 157-167; Niwa T., Journal of Biochemistry (1972) 72: 207-211]. Selektive Glucuronidaseinhibitoren sind in jüngster Zeit synthetisiert worden (Bosslet K., EP 0822192).

Neben dem alleinigen Einsatz zur Therapie können Glucuronidasehemmer auch unterstützend in der Chemotherapie von Krebspatienten zur Erhöhung des erwünschten Effektes bei gleichzeitiger Reduzierung der unerwünschten Wirkungen eingesetzt werden.

Die Chemotherapie bedingt eine außerordentliche physische und psychische Belastung des Krebspatienten. Glucuronidasehemmer können negative Auswirkungen der Chemotherapie mildern und gleichzeitig die Effektivität der Therapie steigern. Dafür bieten sich folgende Ansatzpunkte.

Chemotherapeutika werden unter anderem auch via ihrer Glucuronide über den Darm ausgeschieden. Durch die Wirkungen der dort vorhandenen Glucuronidasen erfolgt eine Spaltung dieser Glucuronide und Freisetzung der aktiven zelltoxischen Substanzen, die das in ständiger Zellteilung und Regeneration befindliche Darmgewebe schädigen. Daraus resultieren für den Patienten Übelkeit, Erbrechen und Durchfall, verbunden mit einem Flüssigkeits- und Gewichtsverlust.

Beta-Glucuronidaseinhibitoren können den Darm vor toxischen Produkten aus Cytostatika-Glucuroniden schützen. So kann z.B. die intestinale Toxizität des Antitumormittels Irinotecan Hydrochlorid, durch präventive Gabe des beta-

Glucuronidaseinhibitors Baicalin minimiert werden. Die Patienten werden so vor einer massiven Diarrhöe und dem damit verbundenen Flüssigkeitsverlust geschützt [Takasuna, K, Jpn J Cancer Res (1995) 86: 978-84; Kamataki T., US-Pat. 5,447,719).

Es bestehen Überlegungen, die Spaltung von Glucuroniden in bestimmten Geweben zu nutzen, um aus inaktiven Vorstufen von wirksamen Arzneimitteln (Prodrugs) die aktiven Substanzen freizusetzen. Durch die bevorzugte Freisetzung in erkrankten Zielgeweben kann über die erhöhte Substanzkonzentration eine mehr oder weniger lokale Wirkung bei geringer systemischer Wirkung erzielt werden [Sperker B., Clin Pharmacokinet (1997) 33: 18-31]. Diese Therapiemöglichkeit wäre vor allem bei der Anwendung nebenwirkungsreicher Substanzen in der Tumorthherapie von Interesse, weil die erwünschten cytotoxischen Eigenschaften von Chemotherapeutika auf das Tumorgewebe konzentriert werden können. Die Tumorprogression und die Metastasenbildung ist häufig mit einer erhöhten beta-Glucuronidaseaktivität verbunden. In nekrotischen Tumorbereichen liegt eine erhöhte Glucuronidaseaktivität im Extrazellulärraum vor, während im gesunden Gewebe die Glucuronidaseaktivität weitgehend intrazellulär lokalisiert ist. Ein im Tumor nach sauer verschobener pH-Wert kann die Aktivität der beta-Glucuronidase nochmals erhöhen. Diese physiologischen Bedingungen bieten Ansatzpunkte für die Applikation von Glucuronsäurekonjugaten mit Chemotherapeutika an Tumorpatienten zur lokalen Freisetzung der wirksamen Substrate nach Spaltung durch die lokal erhöhte Glucuronidaseaktivität [Sperker B., Clin Pharmacokinet (1997) 33: 18-31]. Verstärkt werden könnte die lokale Wirkung durch gleichzeitige Gabe einer Glucuronidprodrug und eines tumorspezifischen Antikörpers, der covalent mit beta-Glucuronidase verbunden ist (Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy = ADEPT) [Sperker B., Clin Pharmacokinet (1997) 33: 18-31].

Die erhöhte Tumorselektivität von Glucuronid-Prodrugs führt zu entsprechend höheren Wirkstoffspiegeln in den Tumoren und gleichzeitig zu niedrigeren Wirkstoffkonzentrationen in gesunden Geweberegionen, d.h. die Effektivitäten und Verträglichkeiten der Chemotherapeutika werden gesteigert.

Bekannte Beispiele sind Doxorubicin-Glucuronid-Prodrugs, welche im Vergleich zum freien Doxorubicin in Tumorgewebe ca. 10-fach höhere Doxorubicinspiegel

ermöglichen, aber gleichzeitig gesundes Gewebe mit einer erniedrigten Konzentration schonen, so daß z.B. die typische kardiotoxische Eigenschaft von Doxorubicin nur noch eine untergeordnete Rolle spielt [Bosslet K., Cell Biophys (1994) 24-25: 51-63; Bosslet K., Cancer Res (1994) 54: 2151-9; Bosslet K., Cancer Res (1998) 58: 1195-201; Murdter, T. E., Cancer Res (1997) 57: 2440-5].

Keine dieser Untersuchungen hat bisher zu therapeutisch nutzbaren Resultaten, d. h. brauchbaren Arzneimitteln, geführt.

Beschreibung der Erfindung

Die Erfindung hat sich zur Aufgabe gestellt, Glucuronidasehemmer zu finden, die ansonsten pharmakologisch nicht oder wenig wirksam sind, d. h. wenige Nebenwirkungen aufweisen, um sie als Arzneimittel in den vorstehend geschilderten Anwendungen alleine oder in Kombination mit anderen Arzneimitteln zur Erhöhung der therapeutischen Breite einzusetzen.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale des Hauptanspruchs gelöst und durch die Merkmale des Unteranspruchs gefördert.

Es ist bekannt, daß Verapamil die Aktivität von bakterieller beta-Glucuronidase (*E. coli*) in einem erheblichen Ausmaß hemmt (B. Sperker et al., Eur. J. Clin. Pharm. (1999), Vol. 55, A. 16), jedoch die Glucuronidase im Darmgewebe von Ratten (Säugetieren) nicht hemmt, im Gegensatz zu bekannten Glucuronidasehemmern wie D-Saccharinsäure-1,4-lactose, welches beim Rattenenzym 30 mal stärker hemmt als bei dem Enzym aus *E. coli*.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß Verapamil auf die im humanen Gewebe vorkommende β -Glucuronidase eine starke Hemmwirkung ausübt. Die Hemmung erfolgt bei einer Applikation von 1 - 10 mg pro kg Körpergewicht und Tag im gleichen Ausmaß durch das racemische Gemisch und die reinen Enantiomere. Es ist bekannt, daß die diversen Wirkungen des als Calciumantagonisten bekannten Verapamils auf das Herz und das Gefäßsystem im wesentlichen vom S-Enantiomeren ausgehen [Mickisch G. H., J Cancer Res Clin Oncol (1995) 121(Suppl 3): R11-R16]. Somit kann bei Anwendung des kaum kardioaktiv wirksamen R-Enantiomeren von Verapamil bzw. Verapamil-Derivaten der erwünschte Hemmeffekt

auf die beta-Glucuronidaseaktivität erzielt werden, ohne daß die für Verapamil bekannten pharmakologischen Wirkungen als unerwünschte Nebenwirkung auftreten.

Insbesondere ist die adjuvante orale Gabe retardierter Arzneimittel aus Verapamil bzw. dessen Derivaten für Anwendungen bestimmt, die über längere Zeiträume den Darm vor den toxischen Spaltprodukten aus wenigtoxischen β -Glucuroniden schützen sollen. Im Falle der adjuvanten Gabe in der Krebstherapie ist die dabei auch auftretende systemische Verteilung der Inhibitoren vom Verapamil-Typ kein Nachteil. Es ist bekannt, daß Verapamil die Behandlung chemotherapieresistenter Krebszellen günstig beeinflusst [Volm M., Anticancer Res 18(C4): 2905-17; Wainer I. W. Ann Oncol (1993) 4(Suppl 2): 7-13]. Dabei werden verschiedene Mechanismen der Wirkungsweise diskutiert, wobei Verapamil die aktive Ausschleusung der Chemotherapeutika aus den Krebszellen unterdrückt [Simpson W. G., Cell Calcium (1985) 6: 449-67] oder etwa die Expression von Multidrug-Resistance-Genen unterbindet [Ling V., Cancer Chemother Pharmacol (1997) 40(Suppl): S3-S8; Mickisch G. H., J Cancer Res Clin Oncol (1995) 121(Suppl 3): R11-R16]. Eine Beteiligung von β -Glucuronidasen ist bei diesen Mechanismen nicht gegeben.

Glucuronidasehemmer des Verapamil-Typs können auch unterstützend bei der Chemotherapie zusammen mit neuartigen Glucuronid-Prodrug-Chemotherapeutika eingesetzt werden. Die Therapieunterstützung mit Glucuronidasehemmern des Verapamil-Typs beinhaltet den Schutz des gesunden Gewebes vor den Wirkungen dieser Chemotherapeutika, insbesondere vor den Wirkungen hoher lokaler Konzentrationen an Einstichstellen oder anderen Zuführungsstellen.

Die Verapamil Gabe und Dosierung erfolgt in der Weise, daß lokal am Infusionszugang das gesunde Gewebe geschont wird, d.h. hier die Glucuronidasen inhibiert werden, aber nach der systemischen Durchmischung im Tumorgewebe keine Deaktivierung der Tumorglucuronidasen stattfindet.

Physiologisch wenig stabile Glukuronidprodrugs können pharmazeutisch durch Zusatz des Glucuronidaseinhibitors-Verapamil so stabilisiert werden, daß erst nach der systemischen Durchmischung im Organismus die Spaltung bevorzugt im Zielgewebe erfolgt.

Bei Gabe biologisch inaktiver Glucuronidprodrugs zusammen mit einem beta-Glucuronidaseinhibitor wird die Spaltung in das wirksame Substrat verzögert, so daß bei Prodrugs mit langer Eliminationshalbwertszeit die systemische Verfügbarkeit verlängert wird. Entsprechend kann die Dosis verringert und das Dosierungsintervall verlängert werden.

Bei der tumorspezifischen Prodrugtherapie wird durch zusätzliche Gabe eines zellmembrandurchlässigen beta-Glucuronidaseinhibitors wie Verapamil die therapeutische Breite dadurch erhöht, daß die weitgehend intrazellulär vorliegende beta-Glucuronidase im gesunden Gewebe inhibiert und dadurch eine pharmakologische Wirkung verhindert wird. Im Tumorgewebe wird durch die physiologisch oder durch ADEPT-Therapie erhöhte Glucuronidasekonzentration das wirksame Substrat bei geeigneter Dosiswahl nach wie vor gebildet.

Die in der Erfindung beanspruchte Hemmwirkung auf die beta-Glucuronidaseaktivität wird in den nachfolgend aufgeführten Ergebnissen belegt.

Untersuchungen zur Senkung der humanen β -Glucuronidase-Aktivität durch Verapamil, seine Metabolite und Gallopamil

Der Calcium-Antagonist Verapamil (sowohl Racemat als auch beide Enantiomere), seine Metabolite und das Derivat Gallopamil sind in der Lage, die Aktivität der menschlichen β -Glucuronidase zu verringern.

Eine direkte Inhibition der β -Glucuronidase-Aktivität konnte bei Experimenten mit humanen Leberhomogenaten gezeigt werden. Dazu wurden Homogenate verschiedener Leberproben mit 2.5 mM 4-Methylbelliferyl- β -D-glucuronid (MUG) inkubiert und mittels HPLC analysiert. Die Konzentrationen des freigesetzten 4-Methylumbelliferons ist ein Maß für die Aktivität der β -Glucuronidase. Bei Homogenaten, die zusätzlich zu MUG noch 100 μ M Verapamil (Racemat) erhielten, war die Aktivität signifikant um ca. 25 % gegenüber der Kontrollproben verringert (Fig. 1).

Parallel bewirken Verapamil, die Metabolite Norverapamil, D702, D703 und Gallopamil in der humanen Hepatom-Zelllinie HepG2 nach 48 h-Inkubation eine

Verringerung der β -Glucuronidase-Aktivität auf 50-65 %, die auf eine gesenkte Expression des Enzyms zurückzuführen ist. Diese Senkung der Aktivität ist konzentrationsabhängig (Fig. 2).

Die Senkung der β -Glucuronidase-Aktivität konnte gleichermaßen stark mit Verapamil-Racemat und mit R- und S-Verapamil beobachtet werden. Die Metabolite Norverapamil, D702 und D703 zeigen einen vergleichbaren Einfluß auf die Aktivität der β -Glucuronidase in HepG2-Zellen. Die Inkubation mit D617, einem weiteren Metaboliten, bewirkt nur eine Senkung der Aktivität um 12 %, die allerdings statistisch nicht signifikant ist. Gallopamil bewirkt einen dem Verapamil vergleichbaren Effekt (Fig. 3).

Beispiel 1

Hemmung der Aktivität humaner Leber- β -Glucuronidase durch Verapamil (Fig. 1).

Humane Leberhomogenate wurden mit dem Enzym-Substrat 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid inkubiert (1 h, 37°C). 100 μ M Verapamil oder DMSO (Kontrolle) wurden dem Reaktionsgemisch zugesetzt. Die Freisetzung von 4-Methylumbelliferon wurde mittels HPLC-Analyse gemessen (*signifikanter Unterschied zur Kontrolle; $p < 0.001$; $n = 3$ unabhängige Experimente).

Beispiel 2

Konzentrationsabhängigkeit der Verapamil-Wirkung in der humanen Hepatom-Zelllinie HepG2 (Fig. 2).

HepG2-Zellen wurden 48 h bei 37°C mit den in Fig. 2 angegebenen Konzentrationen Verapamil inkubiert. Nach Lyse der Zellen wurde jeweils 2.25 μ g zelluläres Protein mit dem β -Glucuronidase-Substrat 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid inkubiert (2h, 37°C) und die Konzentration des freigesetzten 4-Methylumbelliferons mittels HPLC gemessen (*signifikanter Unterschied zur Kontrolle, $p < 0.05$).

Senkung der β -Glucuronidase-Aktivität in HepG2-Zellen durch Inkubation mit Verapamil, Verapamil-Metaboliten und Gallopamil (Abb. 3)

HepG2-Zellen wurden 48h bei 37°C mit 100 μ M Verapamil (Vera), je 100 μ M D617, D702, D703, 30 μ M Norverapamil (Nor) oder 100 μ M Gallopamil (Gallo) inkubiert. Nach Lyse der Zellen wurde die β -Glucuronidase-Aktivität mittels 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid-Spaltung bestimmt (signifikanter Unterschied zur Kontrolle, *P < 0.01, **p < 0.001; n = 3 unabhängige Experimente).

Beispiel 4

Senkung der beta-Glucuronidase-Expresssion durch Verapamil in der humanen Hepatom Zelllinie HepG2 (Abb. 4).

HepG2 Zellen wurden 48 h bei 37°C mit 100 μ M Verapamil oder DMSO (Kontrolle) inkubiert. Nach Lyse der Zellen wurden 50 μ g zelluläres Protein mittels SDS-Page aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und anschließend mit dem monoklonalen Antikörper 2156/42 inkubiert. Die Bandenintensität wurde densitometrisch bestimmt (DE = densitometrische Einheiten; * signifikanter Unterschied zur Kontrolle, p < 0.05; n=3 unabhängige Experimente).

Hemmung der Glucuronidasen im Rattendarm durch Verapamil (Vergleich)

In einer Studie mit Spague-Dawley-Ratten wurde die Absorption von oral applizierten Morphin-6-Glucuronid (M6G) an zwei Gruppen (Gruppe 1: n=5, ohne Verapamilgabe; Gruppe 2: n=4 vorherige Verapamilgabe) untersucht. Die Studie wurde mit Ratten durchgeführt, da diese aus Morphin metabolisch kein M6G bilden [Aasmundstad T.A., Biochem Pharmacol (1993) 46: 961-968], so daß das im Plasma gemessene M6G ausschließlich aus der Absorption des oral gegebenen M6G entstammt.

Während die vorherige Gabe von Verapamil keinen Einfluß auf die Höhe der Plasmakonzentrationen von M6G oder deren Zeitverlauf hatte, waren die Konzentrationen von Morphin und M3G bei vorheriger Verapamil-Gabe (Gruppe 2) deutlich kleiner als bei der Gruppe ohne Verapamil (Gruppe 1) (Abb. 5).

zentrationen von Morphin und M3G bei vorheriger Verapamil-Gabe (Gruppe 2) deutlich kleiner als bei der Gruppe ohne Verapamil (Gruppe 1) (Fig. 5).

Der fehlende Einfluß auf die Höhe der Plasmakonzentration von M6G oder deren Zeitverlauf macht unwahrscheinlich, daß die Verminderung der Morphin- und M3G-Absorption auf einer Hemmung der intestinalen Motilität [Shah M. H., J. Pharm Pharmacol (1987) 39:1037-1038; Krevsky B., Dig Dis Sci (1992) 37:919-924] beruhen. Es ist bekannt, daß M6G die intestinale Motilität mit gleicher Potenz hemmt wie Morphin [Schmidt N., Eur J Pharmacol (1994) 255: 245-237]. Eine Steigerung dieser Hemmung durch Verapamil [Shah M. H., J Pharm Pharmacol (1987) 39: 1037-1038] wirkt sich mit aller Wahrscheinlichkeit auf M6G und Morphin gleichermaßen aus. Dagegen wurden nur die Plasmaspiegel von Morphin bzw. M3G, nicht aber von M6G vermindert, d.h. die Spaltung des nach oraler Applikation intestinal verfügbaren M6G zu Morphin wird somit gehemmt. Daraus resultieren geringere Morphin- und in der Folge M3G-Plasmaspiegel, da der größte Teil des absorbierten Morphins durch Glucuronyl-Transferasen zu M3G metabolisiert wird. Die Versuchsdurchführung wird in Beispiel 5 beschrieben.

Beispiel 5

Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe von Morphin-6-Glucuronid (M6G), Morphin und Morphin-3-Glucuronid (M3G) nach oraler Applikation an Sprague-Dawley-Ratten von M6G, mit oder ohne vorherige orale Applikation von Verapamil (Fig. 5).

Die Untersuchung wurde an 9 männlichen Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt. Die Ratten wurden in 2 Gruppen eingeteilt: Gruppe 1 (5 Tiere, Gewicht: 258.6 ± 31.2 g) erhielt nur 62.5 mg/kg Morphin-6-Glucuronid (M6G) peroral verabreicht. Gruppe 2 (4 Tiere, Gewicht 272 ± 8 g) bekam 15 Minuten vor M6G-Gabe (62.5 mg/kg peroral) 70 mg/kg Verapamil peroral verabreicht. Die Gruppen unterschieden sich hinsichtlich ihres Gewichtes nicht signifikant voneinander (t-Test: $t = -0.923$, $p = 0.401$; Konfidenzintervall für Differenzen Gruppe 1 – Gruppe 2: -51.6 bis 24.8 g).

M6G und Verapamil wurden in Ringer-Laktat gelöst und anschließend mit Tylose-Schleim gemischt. Jeder Ratt wurden 62.5 mg M6G pro kg Körpergewicht in

Tylose-Schleim oral verabreicht. 4 Ratten erhielten 15 min vor der Verabreichung von M6G 70 mg Verapamil pro kg Körpergewicht in Tylose-Schleim oral verabreicht.

Zur Bestimmung der Plasmakonzentrationen von M6G, Morphin und M3G wurden bei jeder Ratte 6 Blutproben (je ca. 200 µl) zu folgenden Zeiten entnommen: vor der Applikation von M6G, sowie 1, 2, 4, 6 und 8 Stunden nach M6G-Gabe. Die Blutproben wurden in heparinisierte EDTA Kunststoffröhrchen überführt und sofort zentrifugiert. Die bereiteten Plasmaproben wurden bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Die Konzentration von M6G, Morphin und Morphin-3-Glucuronid (M3G) wurden mittels HPLC bestimmt (vgl. Hartley R., Biomed Chromatogr (1993) 7: 34-37). Die Nachweisgrenze lag für alle drei Substanzen bei 10 ng/ml, d.h. 35.05 nmol/l für Morphin und 22.45 nmol/l für die Morphinglucuronide. Der Variationskoeffizient lag im gesamten Kalibrationsbereich (10-500 ng/ml) unter 11%.

Hemmung mikrobieller beta-Glucuronidase durch Verapamil

Aus Beispiel 5 ist ersichtlich, daß eine Spaltung von Glucuroniden (M6G) im Darm der Ratte erfolgt. Es ist nicht ersichtlich, ob beta-Glucuronidasen der Ratte und/oder mikrobielle beta-Glucuronidasen (z.B. *E. coli*) für diese Spaltung verantwortlich sind.

Um diese Frage zu klären, wurden beta-Glucuronidasen aus Ratten-Darm-Homogenaten und aus *E. coli* mit Verapamil oder D-Glucarsäure-1,4-lacton in Gegenwart von 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronid (MUG) inkubiert. Die Spaltung von 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronid ist ein Maß für die Aktivität der beta-Glucuronidase. Wie zu erwarten hemmt D-Glucarsäure-1,4-lacton sowohl die beta-Glucuronidase-Aktivität der Ratten-Darm-Homogenate als auch die *E. coli*-beta-Glucuronidase (Fig. 6 A und B). Überraschender Weise wird das bakterielle Enzym von Verapamil deutlich gehemmt ($IC_{50} = 30 \mu M$), hingegen wird die Ratten-beta-Glucuronidase von Verapamil nicht meßbar beeinflusst (Fig. 6 A und B).

Die Versuchsdurchführung wird in Beispiel 6 beschrieben.

Beispiel 6

Hemmung der 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (MUG) Spaltung durch Verapamil und D-Glucarsäure-1,4-lacton (A Ratte, B *E. coli*) (Fig. 6).

Tiefgefrorenes Gewebepulver einer Ratten-Mucosa (duodenum und jejunum) wurde in 20mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1mM pefabloc® (Fa. Roth, Karlsruhe, Germany) suspendiert. Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Lowry bestimmt [Lowry O. H., J Biol Chem (1951) 193:265-275]. Die Inkubation und Analyse erfolgte nach: [Sperker B, J Pharmacol Exp Ther (1997) 281: 914-920]. 50 μ l Inkubationsmischung enthielten 2.25 μ g Ratten-Protein-Homogenat oder 110 pg (0.001 units) gereinigter *E. coli*-beta-Glucuronidase (Fa. Sigma, Deisenhofen, Germany). Die Testpuffer enthielten 0.2 mM MUG (Fa. Sigma, Deisenhofen, Germany).

Die Inkubationsmischungen wurden bei 37°C mit Verapamil oder D-Glucarsäure-1,4-lacton versetzt. Nach 10 Minuten wurden die MUG Puffer zugesetzt. Nach 1 Stunde bei 37°C wurden die enzymatischen Reaktionen durch Zugabe von 150 μ l 200 mM Natriumcarbonat-Lösung gestoppt. Nach Zentrifugation (5 min, 13.000 U/min) wurden die Überstände mittels HPLC (Fluoreszenz: Absorption 355 nm, Emission 460 nm) analysiert. Die Enzymaktivität wurde mit der Freisetzung von 4-Methylumbelliferone (MU) korreliert. Die Versuche wurden bei den entsprechenden pH-Optima der beta-Glucuronidasen (pH 7.0 *E. coli* bzw. pH 5.0 Ratte) durchgeführt. Die Ergebnisse der Fig. 6 zeigen, daß Verapamil nicht in der Lage ist die Glucuronidase der Ratte zu inhibieren, jedoch ein guter Inhibitor für die bakteriellen Glucuronidase aus *E. coli* ist.

Der bekannte Inhibitor D-Glucarsäure-1,4-lacton hemmt dagegen beide Enzyme etwa gleich gut.

Patentansprüche

1. Verwendung von Verapamil oder Verapamilderivaten zur Hemmung von humaner Gewebeglucuronidase.
2. Verwendung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Verapamilderivate dessen R-Enantiomeres, Metabolite von Verapamil, Gallopamil oder chemisch substituierte Derivate von Verapamil, Gallopamil und deren Metabolite oder ihre Salze mit pharmakologisch verträglichen Säuren eingesetzt werden.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die R-Enantiomere in reiner Form oder gegenüber dem Racemat in angereicherter Form eingesetzt werden.
4. Verwendung nach Anspruch 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Glucuronidasehemmer mit geeigneten pharmakologisch verträglichen Hilfsstoffen oralen oder parenteralen, in normal freisetzender oder kontrolliert freisetzender Form verwendet wird.
5. Verwendung nach Anspruch 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Glucuronidasehemmer alleine zur Hemmung der β -Glucuronidase im erkrankten Gewebe eingesetzt wird, um das Fortschreiten der Erkrankung zu verhindern, z.B. durch Hemmung der Tumorprogression oder der Metastasenbildung.
6. Verwendung nach Anspruch 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Glucuronidasehemmer zur Stabilisierung metabolisch gebildeter Glucuronidkonjugate nebenwirkungsreicher Wirkstoffe eingesetzt wird, um deren Nebenwirkungen zu reduzieren bzw. eine Detoxifizierung einzuleiten.

7. Verwendung nach Anspruch 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Glucuronidasehemmer kombiniert mit einem oral einzunehmenden Glucuronidkonjugat eines entzündungshemmenden Wirkstoffes verwendet wird, um dieses im oberen Magen-Darm-Trakt vor einer Spaltung und Resorption zu schützen und in tieferliegenden Darmabschnitten durch Spaltung für die intestinale Lokalthherapie zu aktivieren.
8. Verwendung nach Anspruch 1 bis 4 zur Verbesserung der gewebespezifischen Therapie, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Glucuronidasehemmer bei kombinierter Anwendung mit einer Glucuronidprodrug diese vor der Aktivierung im gesunden Gewebe, bei Erhalt der Aktivierung im Zielgewebe, schützt.
9. Verwendung nach Anspruch 1 bis 4 und 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß neben dem Glucuronidasehemmer und der Glucuronid-Prodrug an gewebespezifische Substanzen (z.B. Antikörper, Proteine, Liposome) gebundene beta-Glucuronidase kombiniert eingesetzt wird, um die Aktivierung der Prodrug im Zielgewebe zu erhöhen und das gesunde Gewebe vor der Aktivierung zu schützen.



1/4

Fig. 1

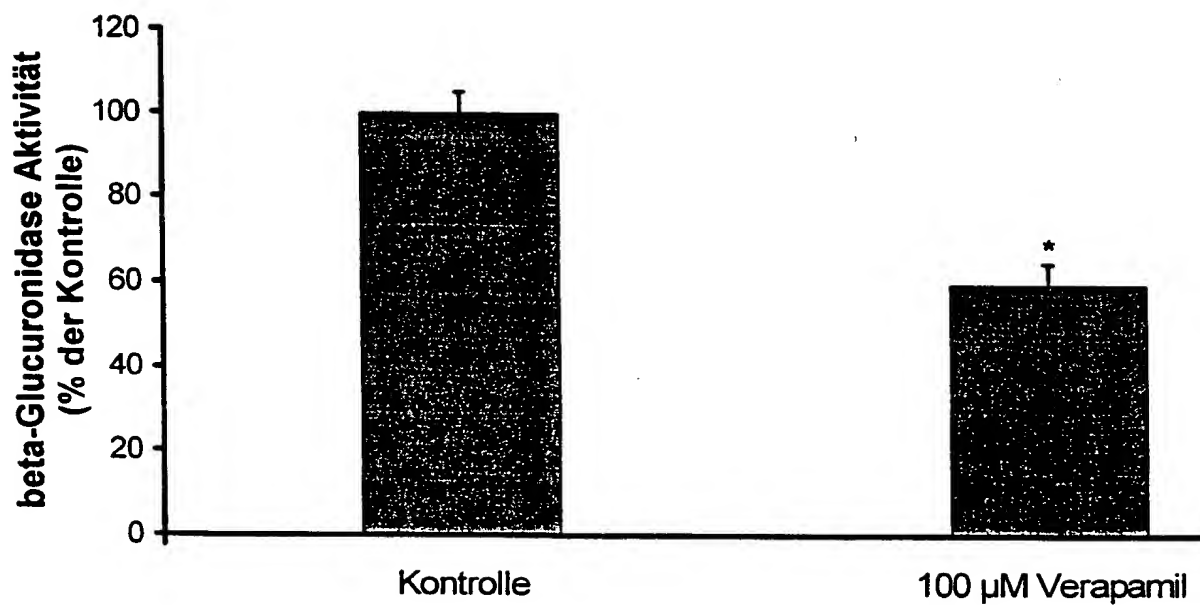
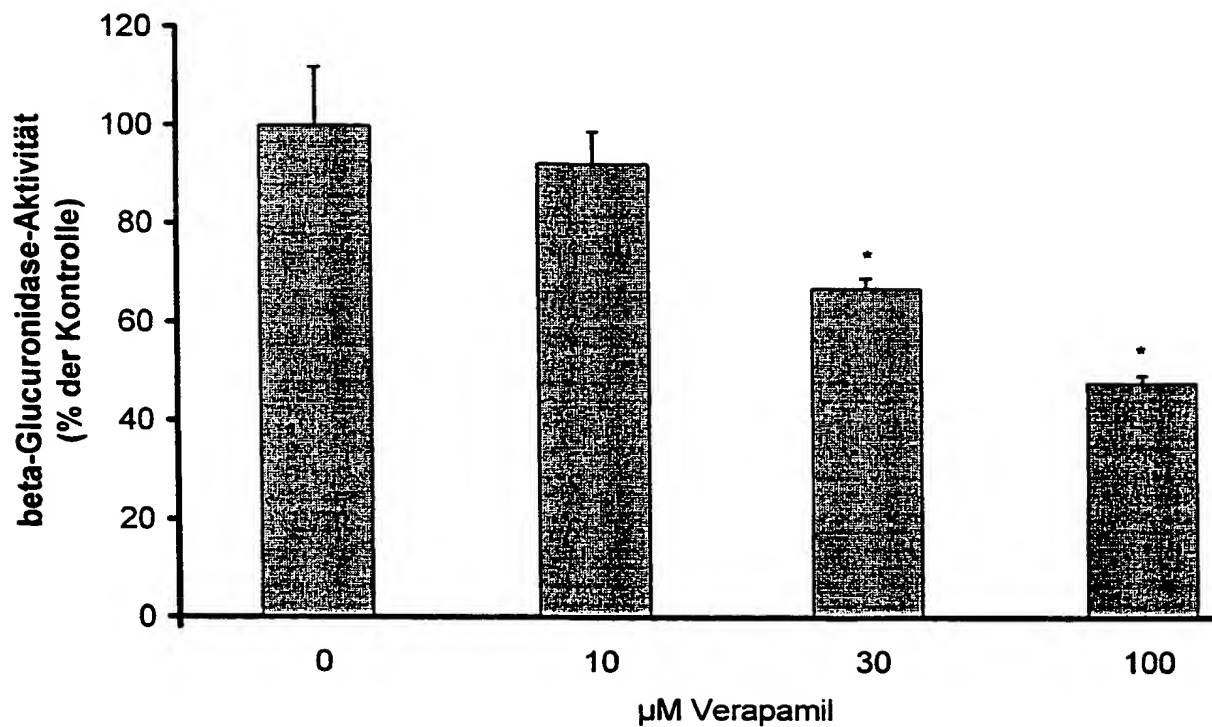


Fig. 2





2/4

Fig. 3

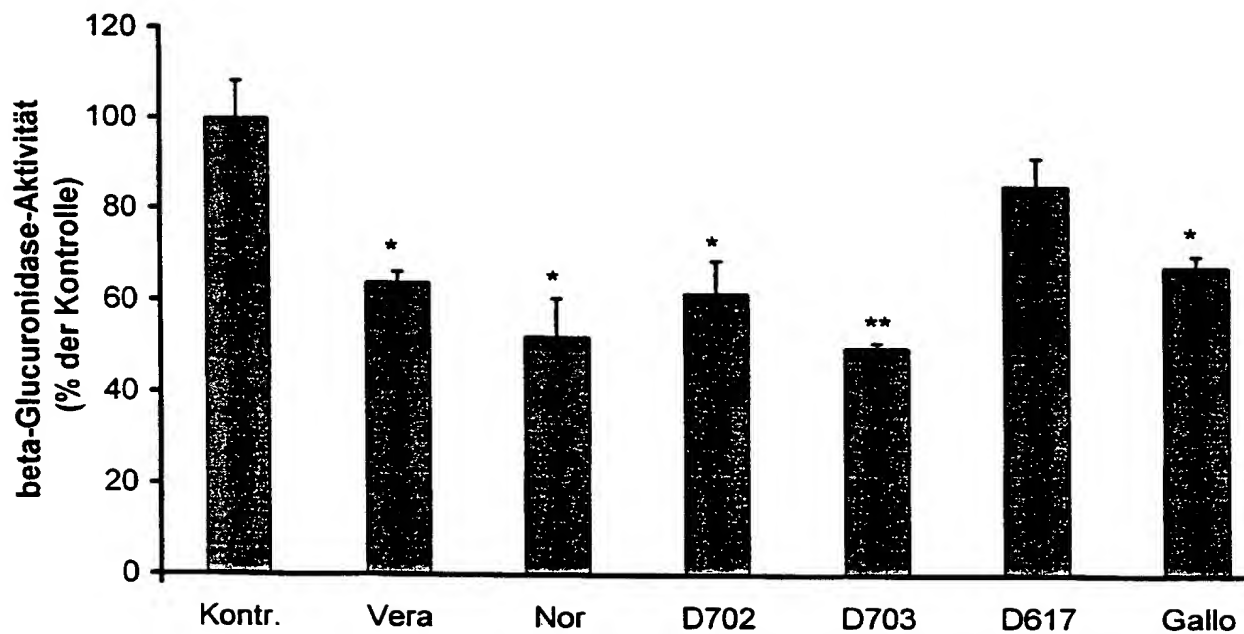
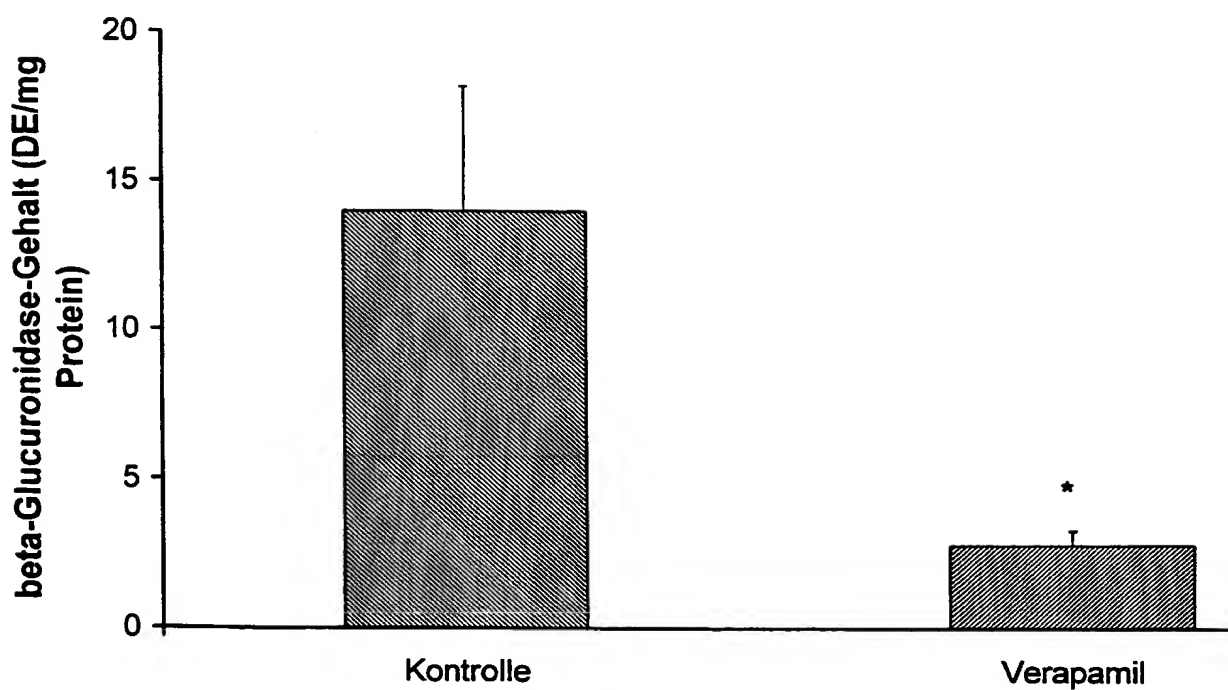


Fig. 4





3/4

Fig. 5

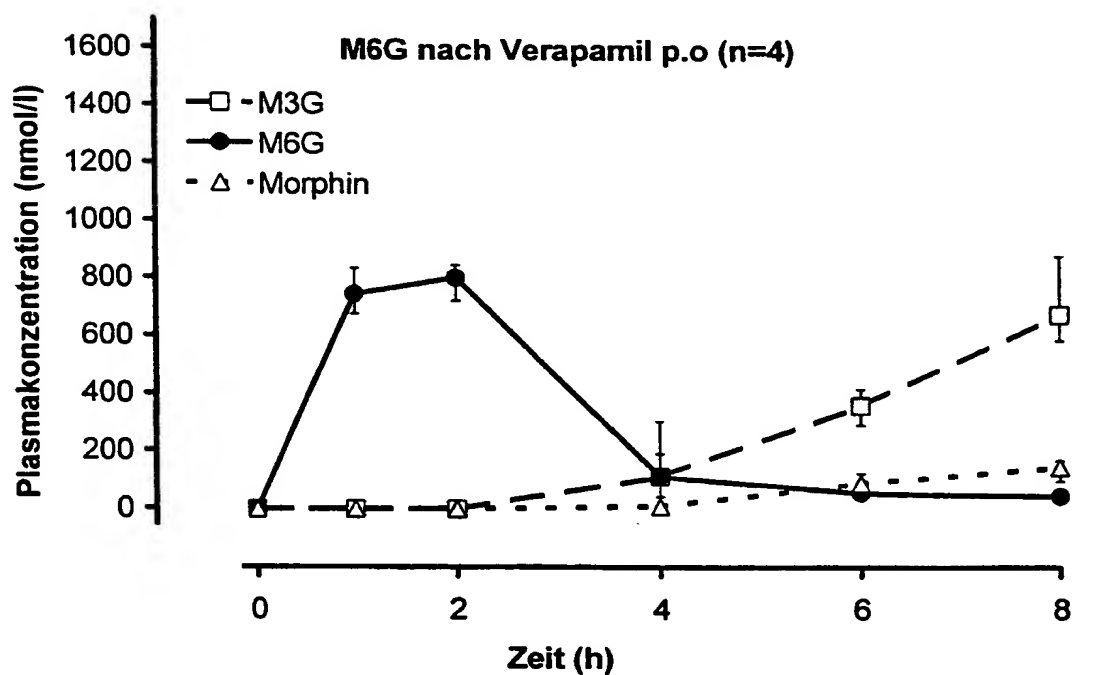
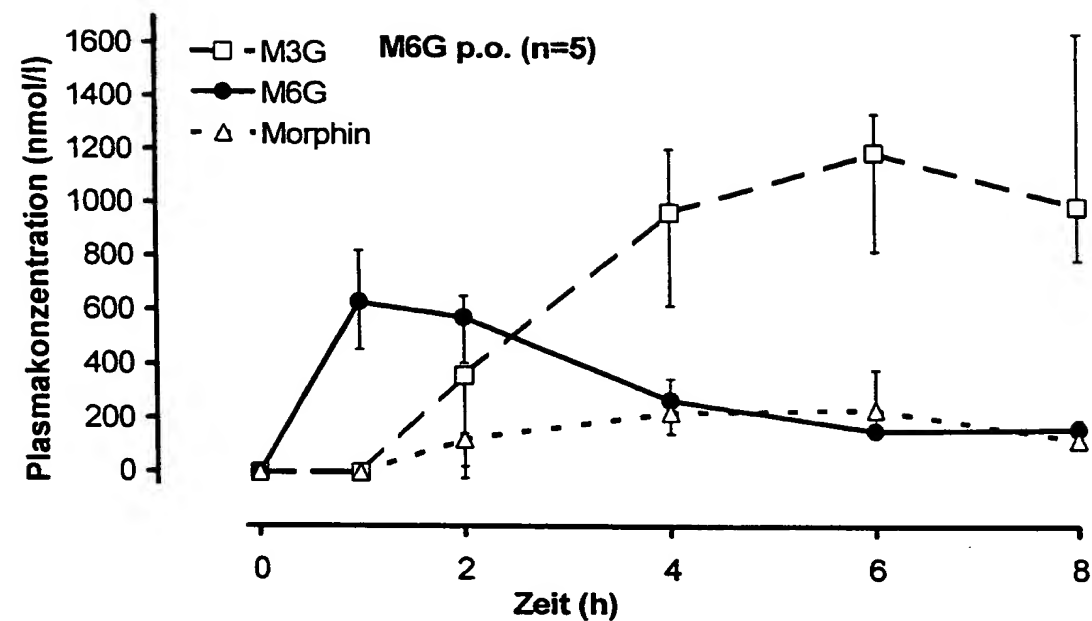
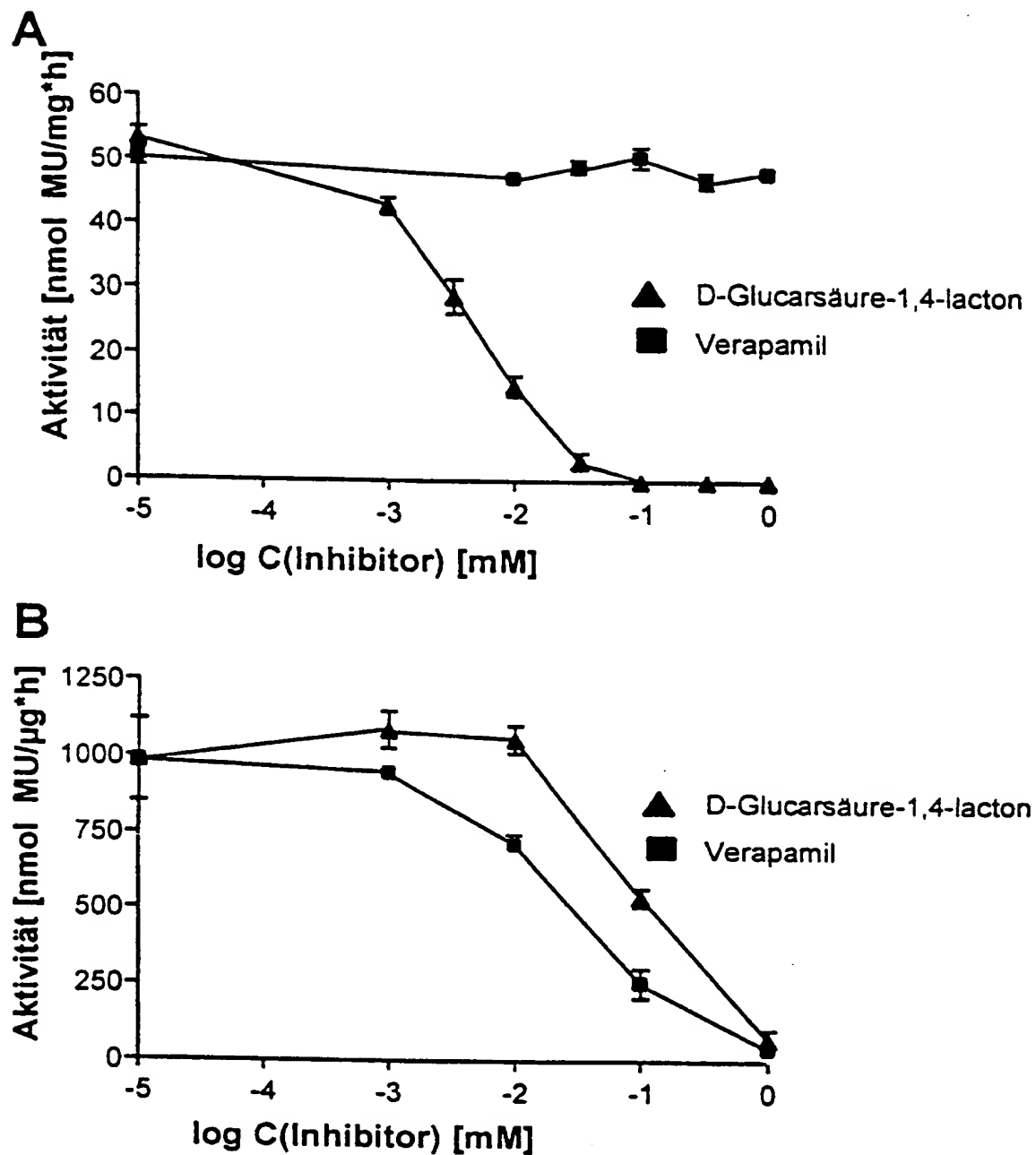




Fig. 6





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In. International Application No

PCT/EP 00/04848

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K31/277 A61P35/00 A61P35/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DESBENE S ET AL: "Application of the ADEPT strategy to the MDR resistance in cancer chemotherapy." ANTI-CANCER DRUG DESIGN, (1999 APR) 14 (2) 93-106. XP000874376	1-5
Y	the whole document	6-8
X	US 4 788 219 A (SAKURAI YOSHIO ET AL) 29 November 1988 (1988-11-29) the whole document	1-5
X	US 5 057 304 A (EICHELBAUM MICHEL ET AL) 15 October 1991 (1991-10-15) the whole document	1-5
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 October 2000

Date of mailing of the international search report

20/10/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Veronese, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/04848

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 647 450 A (BEHRINGWERKE AG) 12 April 1995 (1995-04-12) the whole document ---	6-8
Y	EP 0 595 133 A (BEHRINGWERKE AG ;HOECHST SA LAB (FR)) 4 May 1994 (1994-05-04) claims 1,13; examples 8,29 ---	6-8
Y	SPERKER, B. (1) ET AL: "Drug targeting by glucoronide prodrugs: Regulation of the bioactivating enzyme beta-glucuronidase in the hepatoma cell line HEPG2." NAUNYN-SCHMIEDEBERG'S ARCHIVES OF PHARMACOLOGY, (1998) VOL. 357, NO. 4 SUPPL, PP. R19. MEETING INFO.: 39TH SPRING MEETING OF THE GERMAN SOCIETY FOR EXPERIMENTAL AND CLINICAL PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY MAINZ, GERMANY MARCH 17-19, 1998 GERMAN SOCIETY , XP000952422 abstract ---	6-8
Y	SPERKER, BERNHARD ET AL: "The role of beta- glucuronidase in drug disposition and drug targeting in humans." CLINICAL PHARMACOKINETICS, (1997) VOL. 33, NO. 1, PP. 18-31. , XP000952309 the whole document ---	6-8
A	BOSSLET, KLAUS ET AL: "Elucidation of the mechanism enabling tumor selective prodrug monotherapy." CANCER RESEARCH, (MARCH 15, 1998) VOL. 58, NO. 6, PP. 1195-1201. , XP002108804 the whole document ---	6-8
A	US 5 817 800 A (HOOS ROLAND ET AL) 6 October 1998 (1998-10-06) the whole document -----	6-8

ADDITIONAL MATTER

PCT/ISA/210

Continuation of Box I.2

Patent claims 1-9 relate to compounds that have not been sufficiently characterized. "Verapamil derivatives" and "metabolites of verapamil, gallopamil or chemically substituted derivatives of verapamil, gallopamil and their metabolites or salts" are not unambiguous and comprehensive descriptions of a compounds. In the present case, the use of said of term makes it impossible to carry out a meaningful and complete search. For this reason, the search was limited to the compounds described in pages 6-7 and, whenever possible, it also covered the general idea underlying in the application. Patent claims 1-5 relate to the treatment of diseases which have not been sufficiently characterized. "Inhibiting human tissue glucuronidase" is not an unambiguous and comprehensive description of a disease. In the present case, the use of said term must be regarded as lack of clarity as set forth in PCT Article 6. The lack of clarity is such that a meaningful and complete search is deemed impossible. For this reason, the search was limited to the utilization of the above-mentioned compounds in connection with the diseases described in claim 5 (tumor progression and metastasis formation), and whenever possible, it also covered the general idea underlying in the application.

The applicant's attention is drawn to the fact that patent claims, or parts of patent claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective whether or not the patent claims are amended following receipt of the International Search Report (PCT Art. 19) or whether or not the applicant files new patent claims during any PCT Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/04848

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4788219	A	29-11-1988	JP 2042955 C	09-04-1996
			JP 7053665 B	07-06-1995
			JP 60222420 A	07-11-1985
			EP 0159678 A	30-10-1985
US 5057304	A	15-10-1991	DE 3635930 A	28-04-1988
			AT 64300 T	15-06-1991
			AU 604064 B	06-12-1990
			AU 7999787 A	28-04-1988
			DE 3770766 D	18-07-1991
			EP 0268100 A	25-05-1988
			JP 2046270 C	25-04-1996
			JP 7080767 B	30-08-1995
			JP 63104918 A	10-05-1988
			MX 9203405 A	31-08-1992
EP 0647450	A	12-04-1995	ZA 8707901 A	28-06-1989
			AU 678494 B	29-05-1997
			AU 7169994 A	23-03-1995
			CA 2131662 A	10-03-1995
			EP 0642799 A	15-03-1995
			JP 7149667 A	13-06-1995
			NO 943319 A	10-03-1995
			US 5621002 A	15-04-1997
			ZA 9406920 A	12-04-1995
EP 0595133	A	04-05-1994	DE 4236237 A	28-04-1994
			AU 669218 B	30-05-1996
			AU 5022593 A	12-05-1994
			CA 2109259 A	28-04-1994
			JP 6293665 A	21-10-1994
			NO 933854 A	28-04-1994
			NZ 250030 A	22-12-1994
			US 5955100 A	21-09-1999
			ZA 9307951 A	05-07-1995
US 5817800	A	06-10-1998	DE 19631288 A	05-02-1998
			AU 717219 B	23-03-2000
			AU 3241997 A	12-02-1998
			CA 2212200 A	02-02-1998
			EP 0822192 A	04-02-1998
			JP 10077279 A	24-03-1998

PCT/EP 00/04848

IPK 7 A61K31/277 A61P35/00 A61P35/04

IPK 7 A61K

EPO-Internal, BIOSIS

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 647 450 A (BEHRINGWERKE AG) 12. April 1995 (1995-04-12) das ganze Dokument ---	6-8
Y	EP 0 595 133 A (BEHRINGWERKE AG ;HOECHST SA LAB (FR)) 4. Mai 1994 (1994-05-04) Ansprüche 1,13; Beispiele 8,29 ---	6-8
Y	SPERKER, B. (1) ET AL: "Drug targeting by glucoronide prodrugs: Regulation of the bioactivating enzyme beta-glucuronidase in the hepatoma cell line HEPG2." NAUNYN-SCHMIEDEBERG'S ARCHIVES OF PHARMACOLOGY, (1998) VOL. 357, NO. 4 SUPPL, PP. R19. MEETING INFO.: 39TH SPRING MEETING OF THE GERMAN SOCIETY FOR EXPERIMENTAL AND CLINICAL PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY MAINZ, GERMANY MARCH 17-19, 1998 GERMAN SOCIETY , XP000952422 Zusammenfassung ---	6-8
Y	SPERKER, BERNHARD ET AL: "The role of beta- glucuronidase in drug disposition and drug targeting in humans." CLINICAL PHARMACOKINETICS, (1997) VOL. 33, NO. 1, PP. 18-31. , XP000952309 das ganze Dokument ---	6-8
A	BOSSLET, KLAUS ET AL: "Elucidation of the mechanism enabling tumor selective prodrug monotherapy." CANCER RESEARCH, (MARCH 15, 1998) VOL. 58, NO. 6, PP. 1195-1201. , XP002108804 das ganze Dokument ---	6-8
A	US 5 817 800 A (HOOS ROLAND ET AL) 6. Oktober 1998 (1998-10-06) das ganze Dokument -----	6-8

Fortsetzung von Feld I.2

Die geltenden Patentansprüche 1-9 beziehen sich auf Verbindungen, die nicht ausreichend charakterisiert sind.

"Verapamilderivate" und "Metabolite von Verapamil, Gallopamil oder chemisch substituierte Derivate von Verapamil, Gallopamil und deren Metabolite oder ihre Salze" sind keine eindeutigen und umfassenden Beschreibungen einer Verbindung. Die Verwendung dieses Ausdrucks muß im gegebenen Zusammenhang als Mangel an Klarheit im Sinne von Art. 6 PCT erscheinen. Der Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle vollständige Recherche unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf die in Seite 6 -7 beschriebenen Verbindungen limitiert und, soweit möglich, auf die allgemeine Idee, die der Anmeldung unterliegt, ausgebreitet. Die geltenden Patentansprüche 1-5 beziehen sich auf die Behandlung von Erkrankungen, die nicht ausreichend charakterisiert sind.

"Hemmung von humaner Gewebeglucuronidase" ist keine eindeutige und umfassende Beschreibung einer Erkrankung. Die Verwendung dieses Ausdrucks muß im gegebenen Zusammenhang als Mangel an Klarheit im Sinne von Art. 6 PCT erscheinen. Der Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle vollständige Recherche unmöglich macht. Daher würde die Recherche auf die Verwendung der oben genannten Verbindungen im Zusammenhang mit den in Anspruch 5 beschriebenen Erkrankungen (tumorprogression und Metastasenbildung) limitiert und, soweit möglich, auf die allgemeine Idee, die der Anmeldung unterliegt, ausgebreitet.

Unvollständig recherchierte Patentansprüche: 1-9

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONALE RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

ationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/04848

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der V eröffentlichung
US 4788219 A	29-11-1988	JP 2042955 C JP 7053665 B JP 60222420 A EP 0159678 A	09-04-1996 07-06-1995 07-11-1985 30-10-1985
US 5057304 A	15-10-1991	DE 3635930 A AT 64300 T AU 604064 B AU 7999787 A DE 3770766 D EP 0268100 A JP 2046270 C JP 7080767 B JP 63104918 A MX 9203405 A ZA 8707901 A	28-04-1988 15-06-1991 06-12-1990 28-04-1988 18-07-1991 25-05-1988 25-04-1996 30-08-1995 10-05-1988 31-08-1992 28-06-1989
EP 0647450 A	12-04-1995	AU 678494 B AU 7169994 A CA 2131662 A EP 0642799 A JP 7149667 A NO 943319 A US 5621002 A ZA 9406920 A	29-05-1997 23-03-1995 10-03-1995 15-03-1995 13-06-1995 10-03-1995 15-04-1997 12-04-1995
EP 0595133 A	04-05-1994	DE 4236237 A AU 669218 B AU 5022593 A CA 2109259 A JP 6293665 A NO 933854 A NZ 250030 A US 5955100 A ZA 9307951 A	28-04-1994 30-05-1996 12-05-1994 28-04-1994 21-10-1994 28-04-1994 22-12-1994 21-09-1999 05-07-1995
US 5817800 A	06-10-1998	DE 19631288 A AU 717219 B AU 3241997 A CA 2212200 A EP 0822192 A JP 10077279 A	05-02-1998 23-03-2000 12-02-1998 02-02-1998 04-02-1998 24-03-1998

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts paz 4732 PCT	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/ 04848	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/05/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 07/06/1999
Anmelder PAZ ARZNEIMITTEL-ENTWICKLUNGSGESELLSCHAFT MBH		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 5 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☒ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☐ keine der Abb.

Fortsetzung von Feld I.2

Die geltenden Patentansprüche 1-9 beziehen sich auf Verbindungen, die nicht ausreichend charakterisiert sind.

"Verapamilderivate" und "Metabolite von Verapamil, Gallopamil oder chemisch substituierte Derivate von Verapamil, Gallopamil und deren Metabolite oder ihre Salze" sind keine eindeutigen und umfassenden Beschreibungen einer Verbindung. Die Verwendung dieses Ausdrucks muß im gegebenen Zusammenhang als Mangel an Klarheit im Sinne von Art. 6 PCT erscheinen. Der Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle vollständige Recherche unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf die in Seite 6 -7 beschriebenen Verbindungen limitiert und, soweit möglich, auf die allgemeine Idee, die der Anmeldung unterliegt, ausgebreitet.

Die geltenden Patentansprüche 1-5 beziehen sich auf die Behandlung von Erkrankungen, die nicht ausreichend charakterisiert sind.

"Hemmung von humaner Gewebeglucuronidase" ist keine eindeutige und umfassende Beschreibung einer Erkrankung. Die Verwendung dieses Ausdrucks muß im gegebenen Zusammenhang als Mangel an Klarheit im Sinne von Art. 6 PCT erscheinen. Der Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle vollständige Recherche unmöglich macht. Daher würde die Recherche auf die Verwendung der oben genannten Verbindungen im Zusammenhang mit den in Anspruch 5 beschriebenen Erkrankungen (tumorprogression und Metastasenbildung) limitiert und, soweit möglich, auf die allgemeine Idee, die der Anmeldung unterliegt, ausgebreitet.

Unvollständig recherchierte Patentansprüche: 1-9

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K31/277 A61P35/00 A61P35/04

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DESBENE S ET AL: "Application of the ADEPT strategy to the MDR resistance in cancer chemotherapy." ANTI-CANCER DRUG DESIGN, (1999 APR) 14 (2) 93-106., XP000874376	1-5
Y	das ganze Dokument ---	6-8
X	US 4 788 219 A (SAKURAI YOSHIO ET AL) 29. November 1988 (1988-11-29) das ganze Dokument ---	1-5
X	US 5 057 304 A (EICHELBAUM MICHEL ET AL) 15. Oktober 1991 (1991-10-15) das ganze Dokument --- -/--	1-5

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie^a Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

12. Oktober 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

20/10/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Veronese, A



C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 647 450 A (BEHRINGWERKE AG) 12. April 1995 (1995-04-12) das ganze Dokument ---	6-8
Y	EP 0 595 133 A (BEHRINGWERKE AG ;HOECHST SA LAB (FR)) 4. Mai 1994 (1994-05-04) Ansprüche 1,13; Beispiele 8,29 ---	6-8
Y	SPERKER, B. (1) ET AL: "Drug targeting by glucoronide prodrugs: Regulation of the bioactivating enzyme beta-glucuronidase in the hepatoma cell line HEPG2." NAUNYN-SCHMIEDEBERG'S ARCHIVES OF PHARMACOLOGY, (1998) VOL. 357, NO. 4 SUPPL, PP. R19. MEETING INFO.: 39TH SPRING MEETING OF THE GERMAN SOCIETY FOR EXPERIMENTAL AND CLINICAL PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY MAINZ, GERMANY MARCH 17-19, 1998 GERMAN SOCIETY , XP000952422 Zusammenfassung ---	6-8
Y	SPERKER, BERNHARD ET AL: "The role of beta- glucuronidase in drug disposition and drug targeting in humans." CLINICAL PHARMACOKINETICS, (1997) VOL. 33, NO. 1, PP. 18-31. , XP000952309 das ganze Dokument ---	6-8
A	BOSSLET, KLAUS ET AL: "Elucidation of the mechanism enabling tumor selective prodrug monotherapy." CANCER RESEARCH, (MARCH 15, 1998) VOL. 58, NO. 6, PP. 1195-1201. , XP002108804 das ganze Dokument ---	6-8
A	US 5 817 800 A (HOOS ROLAND ET AL) 6. Oktober 1998 (1998-10-06) das ganze Dokument -----	6-8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/04848

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4788219	A	29-11-1988	JP 2042955 C	09-04-1996
			JP 7053665 B	07-06-1995
			JP 60222420 A	07-11-1985
			EP 0159678 A	30-10-1985
US 5057304	A	15-10-1991	DE 3635930 A	28-04-1988
			AT 64300 T	15-06-1991
			AU 604064 B	06-12-1990
			AU 7999787 A	28-04-1988
			DE 3770766 D	18-07-1991
			EP 0268100 A	25-05-1988
			JP 2046270 C	25-04-1996
			JP 7080767 B	30-08-1995
			JP 63104918 A	10-05-1988
			MX 9203405 A	31-08-1992
			ZA 8707901 A	28-06-1989
EP 0647450	A	12-04-1995	AU 678494 B	29-05-1997
			AU 7169994 A	23-03-1995
			CA 2131662 A	10-03-1995
			EP 0642799 A	15-03-1995
			JP 7149667 A	13-06-1995
			NO 943319 A	10-03-1995
			US 5621002 A	15-04-1997
			ZA 9406920 A	12-04-1995
EP 0595133	A	04-05-1994	DE 4236237 A	28-04-1994
			AU 669218 B	30-05-1996
			AU 5022593 A	12-05-1994
			CA 2109259 A	28-04-1994
			JP 6293665 A	21-10-1994
			NO 933854 A	28-04-1994
			NZ 250030 A	22-12-1994
			US 5955100 A	21-09-1999
US 5817800	A	06-10-1998	ZA 9307951 A	05-07-1995
			DE 19631288 A	05-02-1998
			AU 717219 B	23-03-2000
			AU 3241997 A	12-02-1998
			CA 2212200 A	02-02-1998
			EP 0822192 A	04-02-1998
			JP 10077279 A	24-03-1998



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 12 SEP 2001

WIPO

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

T5

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts paz 4732 PCT	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/04848	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/05/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 07/06/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK A61K31/277		
Anmelder PAZ ARZNEIMITTEL-ENTWICKLUNGSGESELLSCHAFT...et al.		



- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt 12 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☐ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 15/12/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 10.09.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Thalmair, M Tel. Nr. +49 89 2399 2177 



I. Grundlag des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-5 ursprüngliche Fassung

6-11 eingegangen am 15/12/2000 mit Schreiben vom 12/12/2000

Patentansprüche, Nr.:

1-6 eingegangen am 19/06/2001 mit Schreiben vom 18/06/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/4-4/4 eingegangen am 15/12/2000 mit Schreiben vom 12/12/2000

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.



4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
- ☒ Ansprüche Nr. 1-6.

Begründung:

- ☐ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
- ☒ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. 1-6 sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
siehe Beiblatt
- ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:

- ☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.
- ☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

S ktion III + VIII

In den geltenden Patentansprüchen 1-6 wird keine medizinische Indikation / Erkrankung, sondern lediglich ein Wirkmechanismus genannt, i.e. die "Stabilisierung von Glucuronid-Wirkstoffkonjugaten gegen humane Gewebeglucuronidase im menschlichen Blut- oder Intestinaltrakt".

Dadurch bleibt es für den Fachmann unklar (Art. 6 PCT), welche Leiden durch die funktionelle Definition erfaßt werden und damit in den Schutzbereich des Anspruchs fallen, oder m.a.W. für welche und wieviele Krankheiten R-Verapamil oder R-Gallopamil oder ihre Salze mit pharmakologisch verträglichen Säuren tatsächlich indiziert sind.

Es wird festgestellt, daß die Angabe eines Mechanismus innerhalb eines Anspruchs (siehe vorliegender Anspruch 1) nicht benutzt werden kann, um den Gegenstand des Anspruchs vom Stand der Technik abzugrenzen.

Die Entdeckung, daß eine Substanz Glucuronid-Wirkstoffkonjugate gegen humane Gewebeglucuronidase im menschlichen Blut- oder Intestinaltrakt stabilisiert, mag zwar einen wichtigen Beitrag zum wissenschaftlichen Kenntnisstand darstellen, muß jedoch in Form einer definierten, tatsächlichen Behandlung eines pathologischen Leidens zur praktischen Anwendung kommen, um als technischer Beitrag zum Stand der Technik und damit als patentfähige Erfindung zu gelten, was bei vorliegender Anmeldung nicht der Fall ist.

Dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er bereits eine sinnvolle vollständige Recherche unmöglich machte (siehe "Weitere Angaben / Fortsetzung von Feld I.2" im entsprechenden Internationalen Recherchenbericht). Daher wurde die Recherche auf die Verwendung der genannten Verbindungen im Zusammenhang mit den im ursprünglich eingereichten Anspruch 5 beschriebenen Erkrankungen (Tumorprogression und Metastasenbildung) limitiert (siehe *ibidem*).

Durch die Streichung des ursprünglich eingereichten Anspruchs 5 durch den Anmelder (mit Schreiben vom 18.6.01) bleibt nur noch Gegenstand übrig, zu dem keine Recherche vorliegt.

In diesem Zusammenhang wird der Anmelder darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile davon auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können.

Ferner ist der Gegenstand der abhängigen Ansprüche 3-6 unklar in Bezug auf den Begriff "der Glucuronidasehemmer", denn im unabhängigen Anspruch 1 ist keine Rede von einer Glucuronidase-Hemmung.

M 15.12.00

6

Bei Gabe biologisch inaktiver Glucuronidprodrugs zusammen mit einem beta-Glucuronidaseinhibitor wird die Spaltung in das wirksame Substrat verzögert, so daß bei Prodrugs mit langer Eliminationshalbwertszeit die systemische Verfügbarkeit verlängert wird. Entsprechend kann die Dosis verringert und das Dosierungsintervall verlängert werden.

Bei der tumorspezifischen Prodrugtherapie wird durch zusätzliche Gabe eines zellmembrandurchlässigen beta-Glucuronidaseinhibitors wie Verapamil die therapeutische Breite dadurch erhöht, daß die weitgehend intrazellulär vorliegende beta-Glucuronidase im gesunden Gewebe inhibiert und dadurch eine pharmakologische Wirkung verhindert wird. Im Tumorgewebe wird durch die physiologisch oder durch ADEPT-Therapie erhöhte Glucuronidasekonzentration das wirksame Substrat bei geeigneter Dosiswahl nach wie vor gebildet.

Die in der Erfindung beanspruchte Hemmwirkung auf die beta-Glucuronidaseaktivität wird in den nachfolgend aufgeführten Ergebnissen belegt.

Untersuchungen zur Senkung der humanen β -Glucuronidase-Aktivität durch Verapamil, seine Metabolite und Gallopamil

Der Calcium-Antagonist Verapamil (sowohl Racemat als auch beide Enantiomere), seine Metabolite und das Derivat Gallopamil sind in der Lage, die Aktivität der menschlichen β -Glucuronidase zu verringern.

Eine direkte Inhibition der β -Glucuronidase-Aktivität konnte bei Experimenten mit humanen Leberhomogenaten gezeigt werden. Dazu wurden Homogenate verschiedener Leberproben mit 2.5 mM 4-Methylbelliferyl- β -D-glucuronid (MUG) inkubiert und mittels HPLC analysiert. Die Konzentrationen des freigesetzten 4-Methylumbelliferons ist ein Maß für die Aktivität der β -Glucuronidase. Bei Homogenaten, die zusätzlich zu MUG noch 100 μ M Verapamil (Racemat) erhielten, war die Aktivität signifikant um ca. 25 % gegenüber der Kontrollproben verringert (Fig. 1).

Parallel bewirken Verapamil, die Metabolite Norverapamil, D702, D703 und Gallopamil in der humanen Hepatom-Zelllinie HepG2 nach 48 h-Inkubation eine

M 15 12 00

7

Verringerung der β -Glucuronidase-Aktivität auf 50-65 %, die auf eine gesenkte Expression des Enzyms zurückzuführen ist. Diese Senkung der Aktivität ist konzentrationsabhängig (Fig. 2).

Die Senkung der β -Glucuronidase-Aktivität konnte gleichermaßen stark mit Verapamil-Racemat und mit R- und S-Verapamil beobachtet werden. Die Metabolite Norverapamil, D702 und D703 zeigen einen vergleichbaren Einfluß auf die Aktivität der β -Glucuronidase in HepG2-Zellen. Die Inkubation mit D617, einem weiteren Metaboliten, bewirkt nur eine Senkung der Aktivität um 12 %, die allerdings statistisch nicht signifikant ist. Gallopamil bewirkt einen dem Verapamil vergleichbaren Effekt (Fig. 3).

Beispiel 1

Hemmung der Aktivität humaner Leber- β -Glucuronidase durch Verapamil (Fig. 1).

Humane Leberhomogenate wurden mit dem Enzym-Substrat 4-Methylbelliferyl- β -D-glucuronid inkubiert (1 h, 37°C). 100 μ M Verapamil oder DMSO (Kontrolle) wurden dem Reaktionsgemisch zugesetzt. Die Freisetzung von 4-Methylumbelliferon wurde mittels HPLC-Analyse gemessen (*signifikanter Unterschied zur Kontrolle; $p < 0.001$; $n = 3$ unabhängige Experimente).

Beispiel 2

Konzentrationsabhängigkeit der Verapamil-Wirkung in der humanen Hepatom-Zelllinie HepG2 (Fig. 2).

HepG2-Zellen wurden 48 h bei 37°C mit den in Fig. 2 angegebenen Konzentrationen Verapamil inkubiert. Nach Lyse der Zellen wurde jeweils 2.25 μ g zelluläres Protein mit dem β -Glucuronidase-Substrat 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid inkubiert (2h, 37°C) und die Konzentration des freigesetzten 4-Methylumbelliferons mittels HPLC gemessen (*signifikanter Unterschied zur Kontrolle, $p < 0.05$).

M 15.12.00

8

Beispiel 3

Senkung der β -Glucuronidase-Aktivität in HepG2-Zellen durch Inkubation mit Verapamil, Verapamil-Metaboliten und Gallopamil (Fig. 3)

HepG2-Zellen wurden 48h bei 37°C mit 100 μ M Verapamil (Vera), je 100 μ M D617, D702, D703, 30 μ M Norverapamil (Nor) oder 100 μ M Gallopamil (Gallo) inkubiert. Nach Lyse der Zellen wurde die β -Glucuronidase-Aktivität mittels 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid-Spaltung bestimmt (signifikanter Unterschied zur Kontrolle, *P < 0.01, **p < 0.001; n = 3 unabhängige Experimente).

Beispiel 4

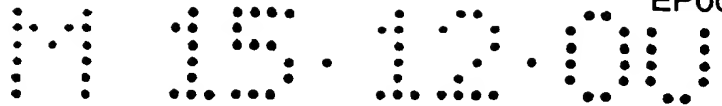
Senkung der beta-Glucuronidase-Expression durch Verapamil in der humanen Hepatom Zelllinie HepG2 (Fig. 4).

HepG2 Zellen wurden 48 h bei 37°C mit 100 μ M Verapamil oder DMSO (Kontrolle) inkubiert. Nach Lyse der Zellen wurden 50 μ g zelluläres Protein mittels SDS-Page aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und anschließend mit dem monoklonalen Antikörper 2156/42 inkubiert. Die Bandenintensität wurde densitometrisch bestimmt (DE = densitometrische Einheiten; * signifikanter Unterschied zur Kontrolle, p < 0.05; n=3 unabhängige Experimente).

Hemmung der Glucuronidasen im Rattendarm durch Verapamil (Vergleich)

In einer Studie mit Spague-Dawley-Ratten wurde die Absorption von oral applizierten Morphin-6-Glucuronid (M6G) an zwei Gruppen (Gruppe 1: n=5, ohne Verapamilgabe; Gruppe 2: n=4 vorherige Verapamilgabe) untersucht. Die Studie wurde mit Ratten durchgeführt, da diese aus Morphin metabolisch kein M6G bilden [Aasmundstad T.A., Biochem Pharmacol (1993) 46: 961-968], so daß das im Plasma gemessene M6G ausschließlich aus der Absorption des oral gegebenen M6G entstammt.

Während die vorherige Gabe von Verapamil keinen Einfluß auf die Höhe der Plasmakonzentrationen von M6G oder deren Zeitverlauf hatte, waren die Kon-



zentrationen von Morphin und M3G bei vorheriger Verapamil-Gabe (Gruppe 2) deutlich kleiner als bei der Gruppe ohne Verapamil (Gruppe 1) (Fig. 5).

Der fehlende Einfluß auf die Höhe der Plasmakonzentration von M6G oder deren Zeitverlauf macht unwahrscheinlich, daß die Verminderung der Morphin- und M3G-Absorption auf einer Hemmung der intestinalen Motilität [Shah M. H., J. Pharm Pharmacol (1987) 39:1037-1038; Krevsky B., Dig Dis Sci (1992) 37:919-924] beruhen. Es ist bekannt, daß M6G die intestinale Motilität mit gleicher Potenz hemmt wie Morphin [Schmidt N., Eur J Pharmacol (1994) 255: 245-237]. Eine Steigerung dieser Hemmung durch Verapamil [Shah M. H., J Pharm Pharmacol (1987) 39: 1037-1038] wirkt sich mit aller Wahrscheinlichkeit auf M6G und Morphin gleichermaßen aus. Dagegen wurden nur die Plasmaspiegel von Morphin bzw. M3G, nicht aber von M6G vermindert, d.h. die Spaltung des nach oraler Applikation intestinal verfügbaren M6G zu Morphin wird somit gehemmt. Daraus resultieren geringere Morphin- und in der Folge M3G-Plasmaspiegel, da der größte Teil des absorbierten Morphins durch Glucuronyl-Transferasen zu M3G metabolisiert wird. Die Versuchsdurchführung wird in Beispiel 5 beschrieben.

Beispiel 5

Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe von Morphin-6-Glucuronid (M6G), Morphin und Morphin-3-Glucuronid (M3G) nach oraler Applikation an Sprague-Dawley-Ratten von M6G, mit oder ohne vorherige orale Applikation von Verapamil (Fig. 5).

Die Untersuchung wurde an 9 männlichen Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt. Die Ratten wurden in 2 Gruppen eingeteilt: Gruppe 1 (5 Tiere, Gewicht: 258.6 ± 31.2 g) erhielt nur 62.5 mg/kg Morphin-6-Glucuronid (M6G) peroral verabreicht. Gruppe 2 (4 Tiere, Gewicht 272 ± 8 g) bekam 15 Minuten vor M6G-Gabe (62.5 mg/kg peroral) 70 mg/kg Verapamil peroral verabreicht. Die Gruppen unterschieden sich hinsichtlich ihres Gewichtes nicht signifikant voneinander (t-Test: $t = -0.923$, $p = 0.401$; Konfidenzintervall für Differenzen Gruppe 1 – Gruppe 2: -51.6 bis 24.8 g).

M6G und Verapamil wurden in Ringer-Laktat gelöst und anschließend mit Tylose-Schleim gemischt. Jeder Ratte wurden 62.5 mg M6G pro kg Körpergewicht in



10

Tylose-Schleim oral verabreicht. 4 Ratten erhielten 15 min vor der Verabreichung von M6G 70 mg Verapamil pro kg Körpergewicht in Tylose-Schleim oral verabreicht.

Zur Bestimmung der Plasmakonzentrationen von M6G, Morphin und M3G wurden bei jeder Ratte 6 Blutproben (je ca. 200 µl) zu folgenden Zeiten entnommen: vor der Applikation von M6G, sowie 1, 2, 4, 6 und 8 Stunden nach M6G-Gabe. Die Blutproben wurden in heparinisierte EDTA Kunststoffröhrchen überführt und sofort zentrifugiert. Die bereiteten Plasmaproben wurden bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Die Konzentration von M6G, Morphin und Morphin-3-Glucuronid (M3G) wurden mittels HPLC bestimmt (vgl. Hartley R., Biomed Chromatogr (1993) 7: 34-37). Die Nachweisgrenze lag für alle drei Substanzen bei 10 ng/ml, d.h. 35.05 nmol/l für Morphin und 22.45 nmol/l für die Morphinglucuronide. Der Variationskoeffizient lag im gesamten Kalibrationsbereich (10-500 ng/ml) unter 11%.

Hemmung mikrobieller beta-Glucuronidase durch Verapamil

Aus Beispiel 5 ist ersichtlich, daß eine Spaltung von Glucuroniden (M6G) im Darm der Ratte erfolgt. Es ist nicht ersichtlich, ob beta-Glucuronidasen der Ratte und/oder mikrobielle beta-Glucuronidasen (z.B. *E. coli*) für diese Spaltung verantwortlich sind.

Um diese Frage zu klären, wurden beta-Glucuronidasen aus Ratten-Darm-Homogenaten und aus *E. coli* mit Verapamil oder D-Glucarsäure-1,4-lacton in Gegenwart von 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronid (MUG) inkubiert. Die Spaltung von 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronid ist ein Maß für die Aktivität der beta-Glucuronidase. Wie zu erwarten hemmt D-Glucarsäure-1,4-lacton sowohl die beta-Glucuronidase-Aktivität der Ratten-Darm-Homogenate als auch die *E. coli*-beta-Glucuronidase (Fig. 6 A und B). Überraschender Weise wird das bakterielle Enzym von Verapamil deutlich gehemmt ($IC_{50} = 30 \mu M$), hingegen wird die Ratten-beta-Glucuronidase von Verapamil nicht meßbar beeinflusst (Fig. 6 A und B).

Die Versuchsdurchführung wird in Beispiel 6 beschrieben.

11 15 12 00

11

Beispiel 6

Hemmung der 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (MUG) Spaltung durch Verapamil und D-Glucarsäure-1,4-lacton (A Ratte, B *E. coli*) (Fig. 6).

Tiefgefrorenes Gewebepulver einer Ratten-Mucosa (duodenum und jejunum) wurde in 20mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1mM pefabloc® (Fa. Roth, Karlsruhe, Germany) suspendiert. Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Lowry bestimmt [Lowry O. H., J Biol Chem (1951) 193:265-275]. Die Inkubation und Analyse erfolgte nach: [Sperker B, J Pharmacol Exp Ther (1997) 281: 914-920]. 50 μ l Inkubationsmischung enthielten 2.25 μ g Ratten-Protein-Homogenat oder 110 pg (0.001 units) gereinigter *E. coli*-beta-Glucuronidase (Fa. Sigma, Deisenhofen, Germany). Die Testpuffer enthielten 0.2 mM MUG (Fa. Sigma, Deisenhofen, Germany).

Die Inkubationsmischungen wurden bei 37°C mit Verapamil oder D-Glucarsäure-1,4-lacton versetzt. Nach 10 Minuten wurden die MUG Puffer zugesetzt. Nach 1 Stunde bei 37°C wurden die enzymatischen Reaktionen durch Zugabe von 150 μ l 200 mM Natriumcarbonat-Lösung gestoppt. Nach Zentrifugation (5 min, 13.000 U/min) wurden die Überstände mittels HPLC (Fluoreszenz: Absorption 355 nm, Emission 460 nm) analysiert. Die Enzymaktivität wurde mit der Freisetzung von 4-Methylumbelliferone (MU) korreliert. Die Versuche wurden bei den entsprechenden pH-Optima der beta-Glucuronidasen (pH 7.0 *E. coli* bzw. pH 5.0 Ratte) durchgeführt. Die Ergebnisse der Fig. 6 zeigen, daß Verapamil nicht in der Lage ist die Glucuronidase der Ratte zu inhibieren, jedoch ein guter Inhibitor für die bakteriellen Glucuronidase aus *E. coli* ist.

Der bekannte Inhibitor D-Glucarsäure-1,4-lacton hemmt dagegen beide Enzyme etwa gleich gut.

Neue Patentansprüche

1. Verwendung von R-Verapamil oder R-Gallopamil oder ihren Salzen mit pharmakologisch verträglichen Säuren zur Herstellung von Arzneimitteln zur Stabilisierung von Glucuronid-Wirkstoffkonjugaten gegen humane Gewebuglucuronidase im menschlichen Blut- oder Intestinaltrakt.
2. Verwendung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die R-Enantiomere in reiner Form oder gegenüber dem Racemat in angereicherter Form eingesetzt werden.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Glucuronidasehemmer mit geeigneten pharmakologisch verträglichen Hilfsstoffen zur Herstellung von oralen oder parenteralen, normal freisetzenden oder kontrolliert freisetzenden Arzneimitteln verwendet wird.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Glucuronidasehemmer zur Stabilisierung metabolisch gebildeter Glucuronidkonjugate nebenwirkungsreicher Wirkstoffe eingesetzt wird, um deren Nebenwirkungen zu reduzieren bzw. eine Detoxifizierung einzuleiten.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Glucuronidasehemmer kombiniert mit einem oral einzunehmenden Glucuronidkonjugat eines entzündungshemmenden Wirkstoffes verwendet wird, um dieses im oberen Magen-Darm-Trakt vor einer Spaltung und Resorption zu schützen und in tieferliegenden Darmabschnitten durch Spaltung für die intestinale Lokalthherapie zu aktivieren.

6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Verbesserung der gewebespezifischen Therapie, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Glucuronidasehemmer bei kombinierter Anwendung mit einer Glucuronidprodrug diese vor der Aktivierung im gesunden Gewebe, bei Erhalt der Aktivierung im Zielgewebe, schützt.

1/4

Fig. 1

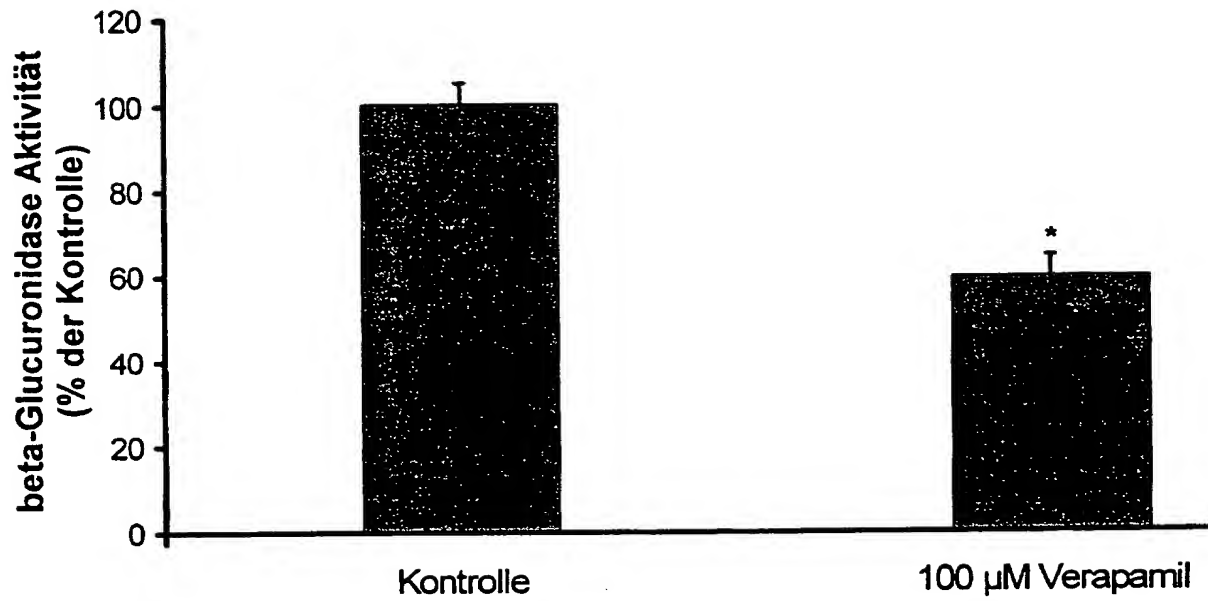
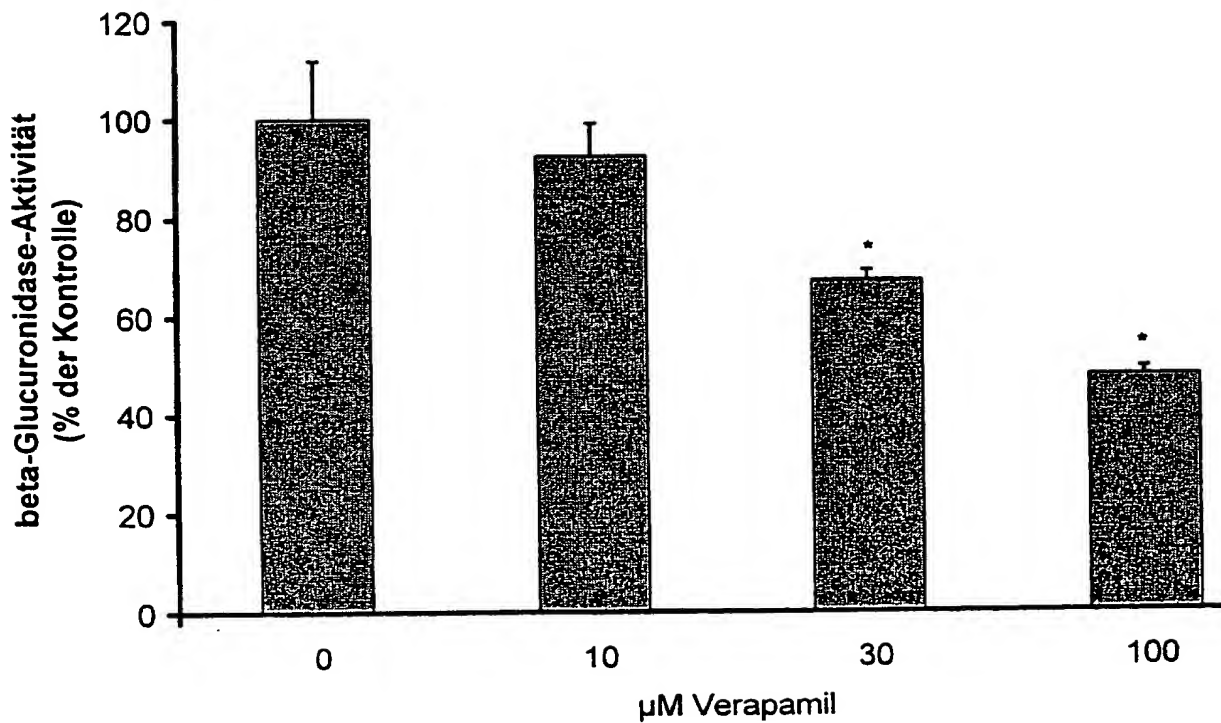


Fig. 2



2/4

Fig. 3

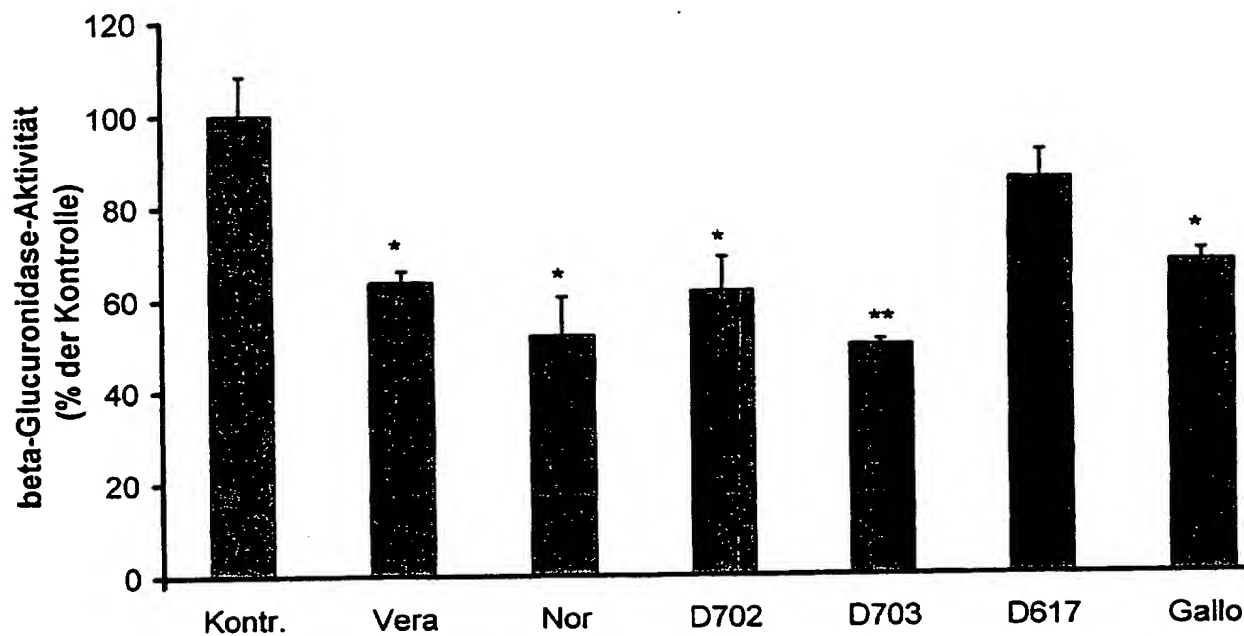
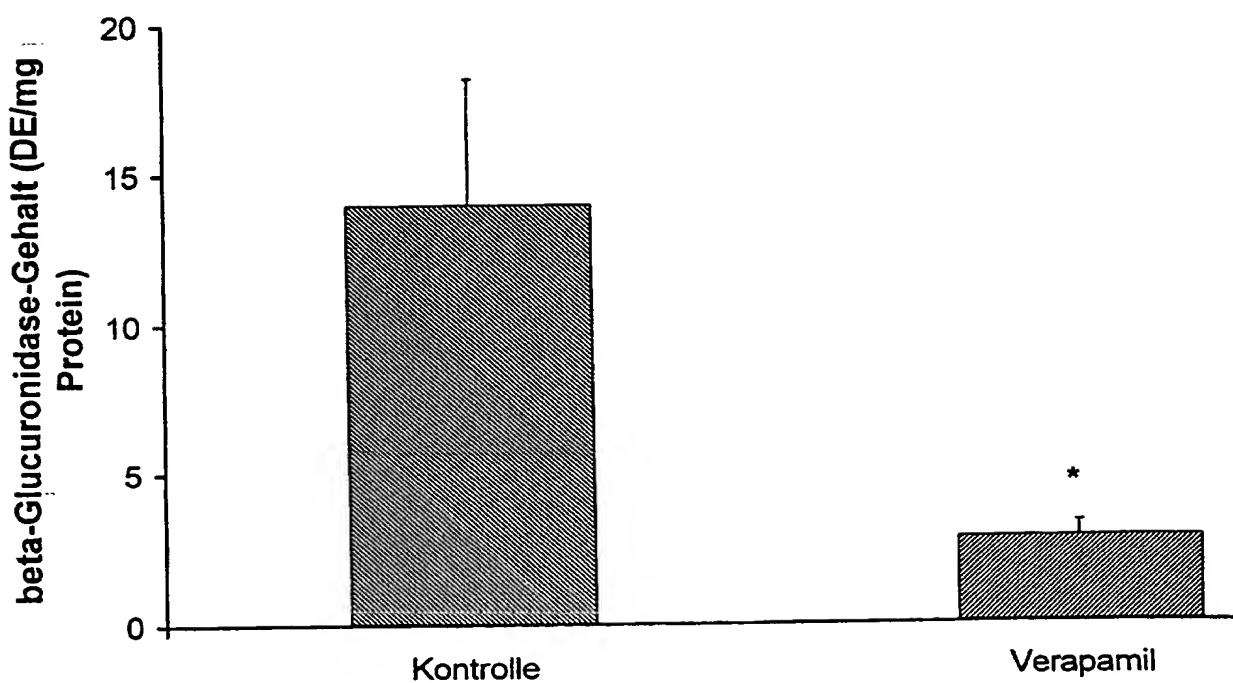


Fig. 4



3/4

Fig. 5

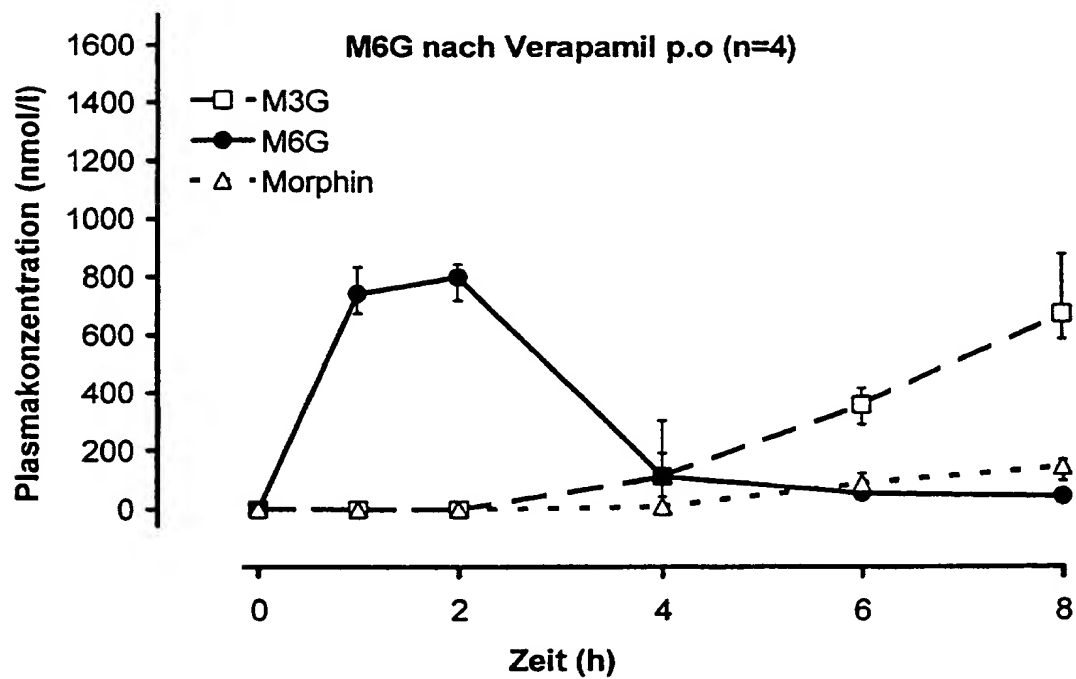
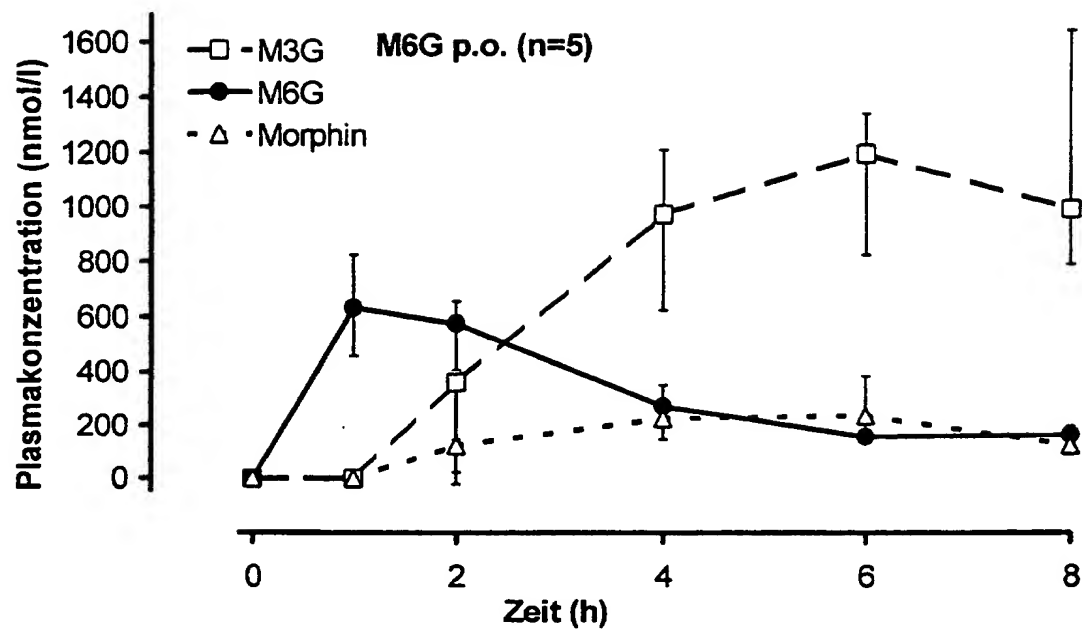
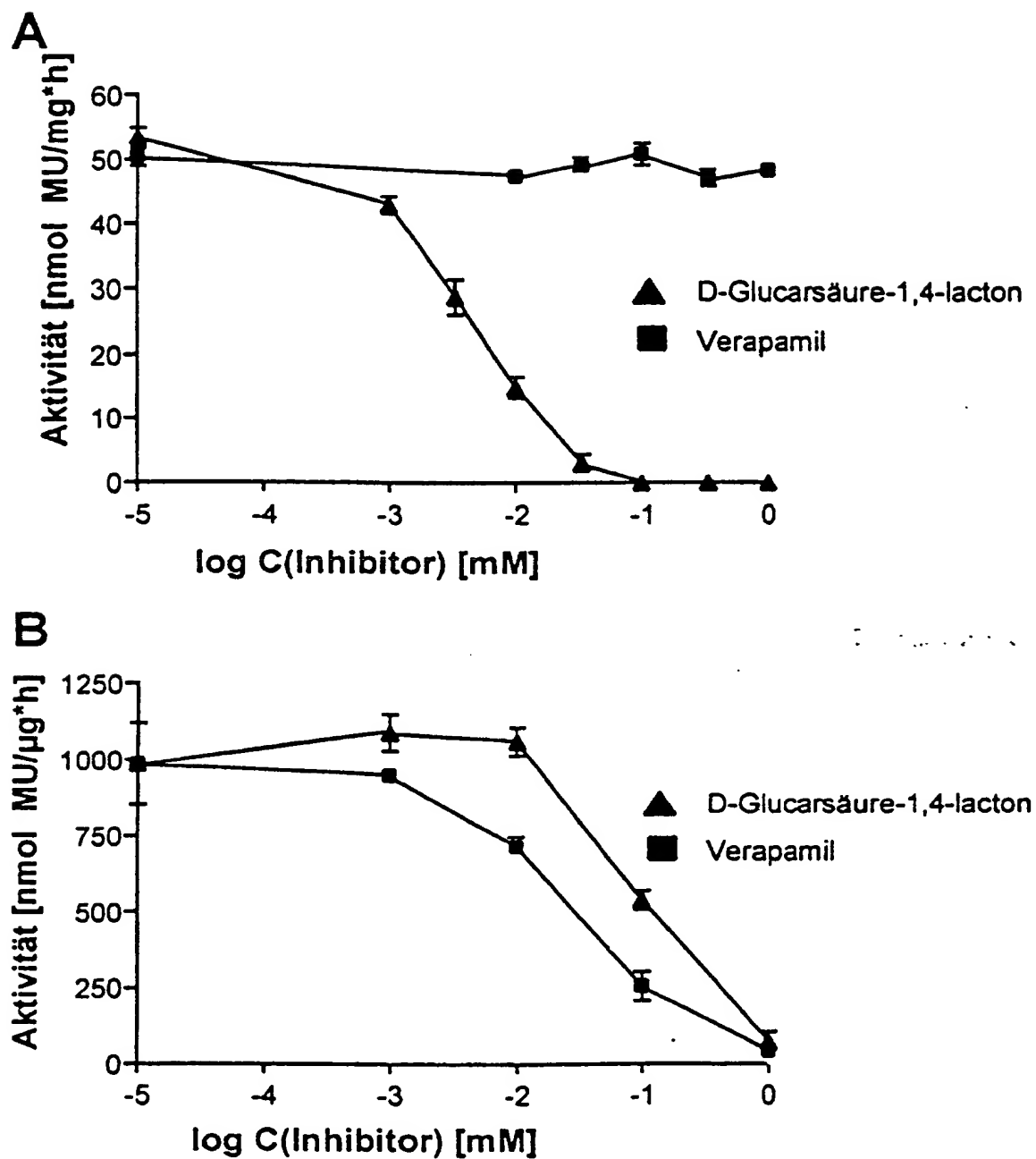


Fig. 6



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 15 February 2001 (15.02.01)	
International application No. PCT/EP00/04848	Applicant's or agent's file reference paz 4732 PCT
International filing date (day/month/year) 27 May 2000 (27.05.00)	Priority date (day/month/year) 07 June 1999 (07.06.99)
Applicant GEISSLINGER, Gerd et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

15 December 2000 (15.12.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:
2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer R. E. Stoffel Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

